

(19)



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

(11) 1012059

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1012059

(51) Int.Cl.⁷
C02F1/32

(22) Ingediend: 12.05.1999

(30) Voorrang:
13.05.1998 US 78116

(41) Ingeschreven:
16.11.1999 I.E. 2000/01

(47) Dagtekening:
25.01.2000

(45) Uitgegeven:
03.04.2000 I.E. 2000/04

(73) Octrooihouder(s):
CALGON CARBON CORPORATION te
Pittsburgh, Pennsylvania, Verenigde Staten van
Amerika (US).

(72) Uitvinder(s):
James Robert Bolton te Ontario (CA)
Richard Douglas Samuel Stevens te Moon
Township, Pennsylvania (US)
Bertrand Dussert te Pittsburgh, Pennsylvania
(US)

(74) Gemachtigde:
Mr. Drs. S.U. Ottevangers c.s. te 2508 DH Den
Haag.

(54) **Werkwijze voor het verhinderen van replicatie in *Cryptosporidium parvum* met behulp van ultraviolet licht.**

(57) De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de preventie van *Cryptosporidium* oöcysten en dergelijke organismen, zoals *Cryptosporidium parvum* en *Giardia muris*, in water, waarbij het water wordt bestraald met een brede band ultraviolet licht in doses van ongeveer 10 mJ/cm² tot ongeveer 175 mJ/cm². Door de behandeling wordt de replicatie van de organismen verhinderd.

BESCHRIJVING

Titel: Werkwijze voor het verhinderen van replicatie in *Cryptosporidium parvum* met behulp van ultraviolet licht

GEBIED VAN DE UITVINDING

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het verhinderen van de replicatie van *Cryptosporidium parvum* in water en in het bijzonder op een werkwijze voor het verhinderen van infecties van *Cryptosporidium* oöcysten en soortgelijke organismen in water, gebruikmakend van lage niveau's ultraviolet licht.

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Het is in het algemeen welbekend dat het nodig is om xx oöcysten te doden of inactiveren zodat ze niet infecteren. Dit is vooral van belang in drinkwater. Een zo'n methode is het gebruik van ultraviolet ("UV") licht. De stand van de techniek leert, dat een UV dosis van ten minste 3000 mJ/cm² vereist is voor inactivering van *Cryptosporidium parvum* (Lorenzo-Lorenzo et al., J. Parasitol. 1993, 79, 67-70) en *Giardia muris* (E.L. Jarol, "Effect of disinfectants on *Giardia* cysts", CRC Critical Reviews in Environmental Control, 1988, 18, 1-28). Snowball en medewerkers (Britse octrooiaanvraag #9416287.2, 8 nov. 1984; Wat. Res. 1995, 29, 2583-2586) ontwikkelden een inrichting die eerst oöcysten van *Cryptosporidium* uitfiltreert en ze dan blootstelt aan UV doses van 350-400 mJ/cm². De octrooipublicatie leert het gebruik van membraanfilters om *Cryptosporidium* oöcysten te vangen, die vervolgens bestraald worden met een batterij van lage-druk kwiklampen voor een UV dosis van 350-400 mJ/cm². Het filter wordt dan in omgekeerde richting gewassen naar een tweede filter toe en de bestraling wordt herhaald. De octrooipublicatie vermeldt dat de behandeling de organismen "doodt".

M.J. Lorenzo-Lorenzo, M.E. Area-Mazea, I. Villacorta-Martinez de Maturana en D. Duran-Oreiro, "Effect of Ultraviolet Disinfection of Drinking Water on the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts", J. Parasitol. 1993, 79(1), 67-70. Het artikel rapporteert de vermindering van infectie in muizen na blootstelling gedurende ten minste 150 minuten aan UV uit een (vermoedelijk) lage-druk kwiklamp. Hoewel het artikel niet duidelijk is, kan daaruit worden afgeleid dat de toegepaste UV dosis meer dan 5000 mJ/cm² was voor het verkrijgen van een meer dan 2 log reductie in infectiviteit. De auteurs beweren dat blootstelling aan UV gedurende 150 minuten of langer de infectiviteit "elimineert", maar ze geven geen ander mechanisme dan dat "UV straling DNA verbreekt doordat het de vorming van th[yl]amine dimeren veroorzaakt, en hoge niveau's kunnen tot celdood leiden". Bij de door hen toegepaste UV doses werden de waargenomen effecten vrijwel zeker door celdood veroorzaakt.

In een artikel van A. Bushnell, W. Clark, J. Dunn en K. Salisbury, "Pulsed Light Sterilization of Products Packaged by Blow-Fill-Seal Techniques", Pharm. Engin. 1997, Sept./Okt., 74-83, wordt een techniek met UV pulsen beschreven voor het "steriliseren" van oppervlakken die bacteriën, fungi, sporen, virussen, protozoa en oöcysten bevatten. Vermeld werd dat de vereiste UV doses boven 1000 mJ/cm² liggen. De effectiviteit van de methode werd beoordeeld naar de infectiviteit bij muizen. Bij de gerapporteerde UV doses werden de effecten gedacht te wijten te zijn aan celdood.

In een artikel van R. LaFrenz, "High Intensity Pulsed UV for Drinking Water Treatment", Proc. AWWA WQT Conference, Denver, CO, Nov. 1997, werd een soortgelijk systeem met pulsen beschreven. Hoewel erg weinig details werden beschreven, blijkt dat een muizen-infectiviteitstest werd gebruikt en met een beweerde

100% "inactivering" van *Cryptosporidium* tot een niveau van 6 log bij energieniveau's van ongeveer 200 mJ/cm² en hoger. Het artikel beweert dat het gepulseerde UV het "DNA herstelmechanisme" overwint; de toegepaste UV doses zijn echter veel hoger dan vereist zijn met een constante middelbare-druk kwiklamp.

Het is derhalve een doel van de uitvinding om een werkwijze te verschaffen voor het behandelen van water op zulk een effectieve wijze dat *Cryptosporidium* oöcysten niet kunnen infecteren. Een ander doel van de uitvinding is om een werkwijze te verschaffen waarbij ultraviolet licht wordt gebruikt om de *Cryptosporidium* oöcysten infectie-ineffectief te maken. Weer een ander doel van de onderhavige uitvinding is om een werkwijze te verschaffen waarin ultraviolet licht wordt gebruikt, welke werkwijze kosteneffectief is voor het behandelen van drinkwater om de mogelijkheid van infectie door *Cryptosporidium* oöcysten te elimineren.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

Algemeen gesproken is gevonden dat het niet nodig is om pathogenen, zoals *Cryptosporidium parvum* of *Giardia muris* met ultraviolet licht te "doden" of "inactiveren" om infectie te verhinderen; er behoeft slechts voldoende ultraviolet licht te worden toegepast om te verhinderen dat het organisme "repliqueert". De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding verhindert replicatie (celmitose) door verknoping van het DNA om infectie te verhinderen. De UV doses die nodig zijn om replicatie te verhinderen, zijn ordes van grootte lager dan nodig zijn voor het "doden" of "inactiveren" van de oöcysten. Dit betekent dat de kosten van UV behandeling ter vermindering van infectie door *Cryptosporidium* oöcysten aanzienlijk lager zullen zijn.

Er is gevonden dat wanneer biologische organismen aan ultraviolet licht (UV) in het gebied van 200-300 nm

worden blootgesteld, het UV door DNA, RNA en eiwitten geabsorbeerd kan worden. Absorptie van eiwitten kan tot openbreken van celwanden en dood van het organisme leiden. Het is bekend dat absorptie door DNA of RNA (specifiek door thymine basen) verknoping van de DNA of RNA dubbele helix strengen veroorzaakt door de vorming van thymine dimeren. Als genoeg van deze verknopingen in DNA worden gevormd, kan het DNA zich niet in twee strengen scheiden en daardoor kan de cel in mitose niet repliceren. Cellen die niet kunnen repliceren, kunnen niet infecteren. De onderhavige uitvinding gebruikt aanzienlijk lagere UV doses voor het bereiken van de toestand van gehinderde replicatie, welke doses veel lager zijn (in ordes van grootte) dan de doses die vereist zijn om vernietiging van de oöcystcellen te veroorzaken.

De onderhavige uitvinding gebruikt een brede-band (200-300 nm) middelbare-druk UV lamp om de preventie te realiseren. De vereiste dosis kan zo laag zijn als 10 mJ/cm². Doses boven 30 mJ/cm² geven meer dan 4,5 log verwijdering, gemeten naar muizen-infectiviteit. De dosisniveau's zijn dus significant lager dan eerder werden gebruikt, wat tot gevolg heeft dat significant lagere stroomniveau's nodig zijn om de resultaten te bereiken. De werkwijze verschaft derhalve een aanzienlijke stijging van de kosten-effectiviteit van UV reductie in *Cryptosporidium* oöcysten infectie in drinkwater. Andere voordelen zullen duidelijk worden uit de hiernavolgende gedetailleerde beschrijving van een momenteel geprefereerde uitvoeringsvorm van de uitvinding.

BEKNOPTTE FIGUURBESCHRIJVING

Figuur 1 is een diagram dat het verschil toont tussen de infectiviteitstest en de in vitro (excystatie en vitale kleurstoffen) tests, en

Figuur 2 is een diagram dat de correlatie tussen laboratoriumschaal en pilottests toont.

MOMENTEEL GEPREFEREERDE UITVOERINGSVORM

Pilottest uitdagingen van *Cryptosporidium parvum* en *Giardia muris* werden uitgevoerd in een 111 L (29,4 gal) UV reactor, die 6 x 1 kW Rayox middelbare-druk UV lampen, horizontaal gemonteerd in een toren-type reactor, bevatte. De organismen werden voor de reactor stroomopwaarts van een statische menger geïntroduceerd en achter de reactor op 1 micrometer filters verzameld. De totale stroomsnelheid tijdens de test bedroeg ongeveer 215 gpm (814 L/minuut). De organismen werden uit het filter geëxtraheerd en geconcentreerd. Vier van de Crypto monsters werden aan muizen gegeven. Deel van het concentraat werd achtergehouden voor in vitro tests.

De UV doses werden berekend uit de gemiddelde bestraling (bepaald uit een geavanceerd mathematisch model van de reactor) maal de verblijftijd in de reactor (ongeveer 8,3 sec). De dosis werd gevarieerd door een of twee lampen aan te zetten en op laag of hoog vermogen.

Samenvatting van de resultaten

In vitro tests

Er werden twee in vitro tests gebruikt: vitale kleurstoffen en excystatie. Er werd vastgesteld dat de procescontrole middelbare levensvatbaarheidswaarden 71,7% bedroegen in de vitale kleurstoffen test. De voor normalisatie van deze levensvatbaarheidswaarden op 100% benodigde factor werd berekend door 100 te delen door 71,7 = 1,39. Na blootstelling van oöcysten aan verschillende UV doses, werden hun feitelijke levensvatbaarheidswaarden bepaald (Tabel 1) en vervolgens

genormaliseerd door elke levensvatbaarheidswaarde te vermenigvuldigen met de berekende factor (1,39). Op gelijke wijze werden *Cryptosporidium* en *Giardia* procescontrole excystatiewaarden op 100% genormaliseerd en werd hun respectievelijke normalisatiefactor gebruikt om de feitelijke excystatiewaarden voor organismen, die aan UV waren blootgesteld, bij te stellen. Deze resultaten worden berekend als het percentage levensvatbaarheid voor een UV test gedeeld door het percentage levensvatbaarheid voor de procescontrole. Aldus te werk gaande veranderen de levensvatbaarheidsfactoren (in procent) voor in vitro tests in die welke in onderstaande tabel worden getoond.

Levensvatbaarheidsfactoren (%) voor in vitro tests			
UV dosis (mJ/cm ²)	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia muris</i>
	Vitale kleurstoffen	Excystatie	Excystatie
20	113 ± 36	145 ± 38	174 ± 14
69	110 ± 34	176 ± 38	103 ± 48
137	37 ± 17	83 ± 21	68 ± 32
152	13 ± 14	29 ± 31	31 ± 13
167	8 ± 7	33 ± 10	33 ± 8

Opm. eventuele waarden boven 100% moeten gelezen worden als 100%.

Log reducties voor de *Cryptosporidium parvum* muizen-infectiviteitstests

UV Dosis (mJ/cm ²)	Log reductie
20	3,9
69	▶ 4,5
167	▶ 4,5

Gedetailleerde analyse van gegevens

Tabel 1. In vitro tests van UV bestraling op *Cryptosporidium parvum* en *Giardia muris* levensvatbaarheid

Test parameters	<i>Cryptosporidium parvum</i> levensvatbaarheid (n=3)			<i>Giardia muris</i> levensvatbaarheid (n=3)	
	UV dosis mJ/cm ²	vitale kleur- stoffen	excys- tatie	UV dosis mJ/cm ²	excys- tatie
<u>Test 30-3-98</u>					
Trip controle 1		82,0±4,0	81,4±8,1		90±7,1
procescontrole- geen UV		71,7±15,4	29,7±1,1		53,2±21,5
		61,7±4,9	45±7*		
<u>Test 31-3-98</u>					
Trip controle 2		90,46±1,2	79,8±4,3		97,3±2,5
UV test	167	4,9±4,5	13,7±3,1	167	19,9±2,7
<u>Test 1-4-98</u>					
Trip controle 3		88,7±1,0	56±9,8		100±0
			89±2,7*		
UV test	69	73,6±4,1	72,7±2,3	67	55±13
<u>Test 6-4-98</u>					
Trip controle 4		76,6±4,4	80,4±1,7		99±1
UV test	152	8,5±1,4	12,1±1,5	152	23±9,6
<u>Test 7-4-98</u>					
Procescontrole 2 geen UV		45,3±16,8	49,3±4,0		96,7±1,2
UV test	137	25±8,9	34,3±4,0	137	36,4±9,1
<u>Test 8-4-98</u>					
Trip controle 5		79,7±5,1	77,3±4,2		94,7±3,1
UV test	20	75,3±6,8	47±7,8	21	92,7±1,2
			72,7±1*		

Tabel 2. Effecten van UV bestraling op *Cryptosporidium parvum* oöcyst infectiviteit.

Testparameters	UV	<i>Cryptosporidium parvum</i>		
	dosis	infectiviteit		
	mJ/cm ²	inocula 1	inocula 2	inocula 3

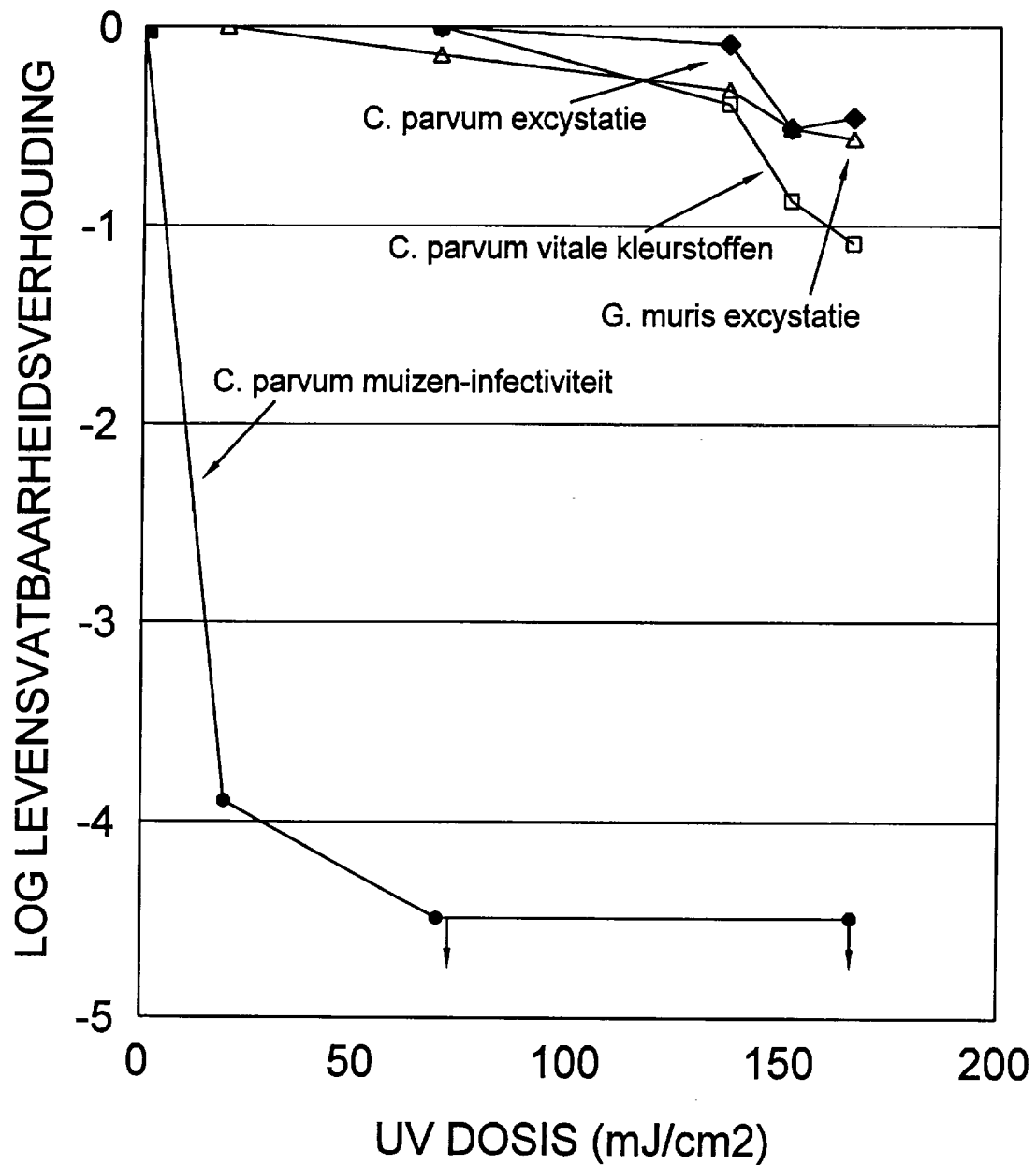
<u>Trip controle 1</u>				
per muis afgegeven inocula		25	75	150
% geïnfecteerd		5,3%	35%	62,5%
(#/totaal)		(2/28)	(14/40)	(15/23)
<u>Procescontrole 1</u>				
per muis afgegeven inocula		50	500	5000
% geïnfecteerd		44%	100%	100%
(#/totaal)		(11/15)	(20/20)	(23/23)
<u>UV test 31-3-98</u>				
per muis afgegeven inocula		1000	10000	100000
% geïnfecteerd	191	0%	0%	0%
(#/totaal)		(0/24)	(0/12)	(0/24)
<u>UV test 1-4-98</u>				
per muis afgegeven inocula		1000	10000	100000
% geïnfecteerd	79	0%	0%	0%
(#/totaal)		(0/22)	(0/26)	(0/25)
<u>UV test 8-4-98</u>				
per muis afgegeven inocula		1000	10000	100000
% geïnfecteerd	23	0%	0%	4,5%
(#/totaal)		(0/18)	(0/18)	(1/22)

Hoewel een momenteel geprefereerde uitvoeringsvorm van de uitvinding in detail is beschreven, kan de uitvinding op andere wijzen worden uitgevoerd binnen de omvang van de conclusies.

Nieuwe Conclusies

1. Werkwijze voor de preventie van *Cryptosporidium* oöcysten. omvattende bestralen van water met een continue brede band ultraviolet licht in doses van ongeveer 10 mJ/cm² tot ongeveer 175 mJ/cm².
- 5 2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin de genoemde brede band een frequentie is van 200 tot 300 nm onder toepassing van een UV lamp.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 waarin de genoemde doses ongeveer 20 mJ/cm² tot ongeveer 30 mJ/cm² bedraagt.

LOG OVERLEVINGSVERHOUDING VS. UV DOSIS



LOG OVERLEVINGSVERHOUDING VS. UV DOSIS

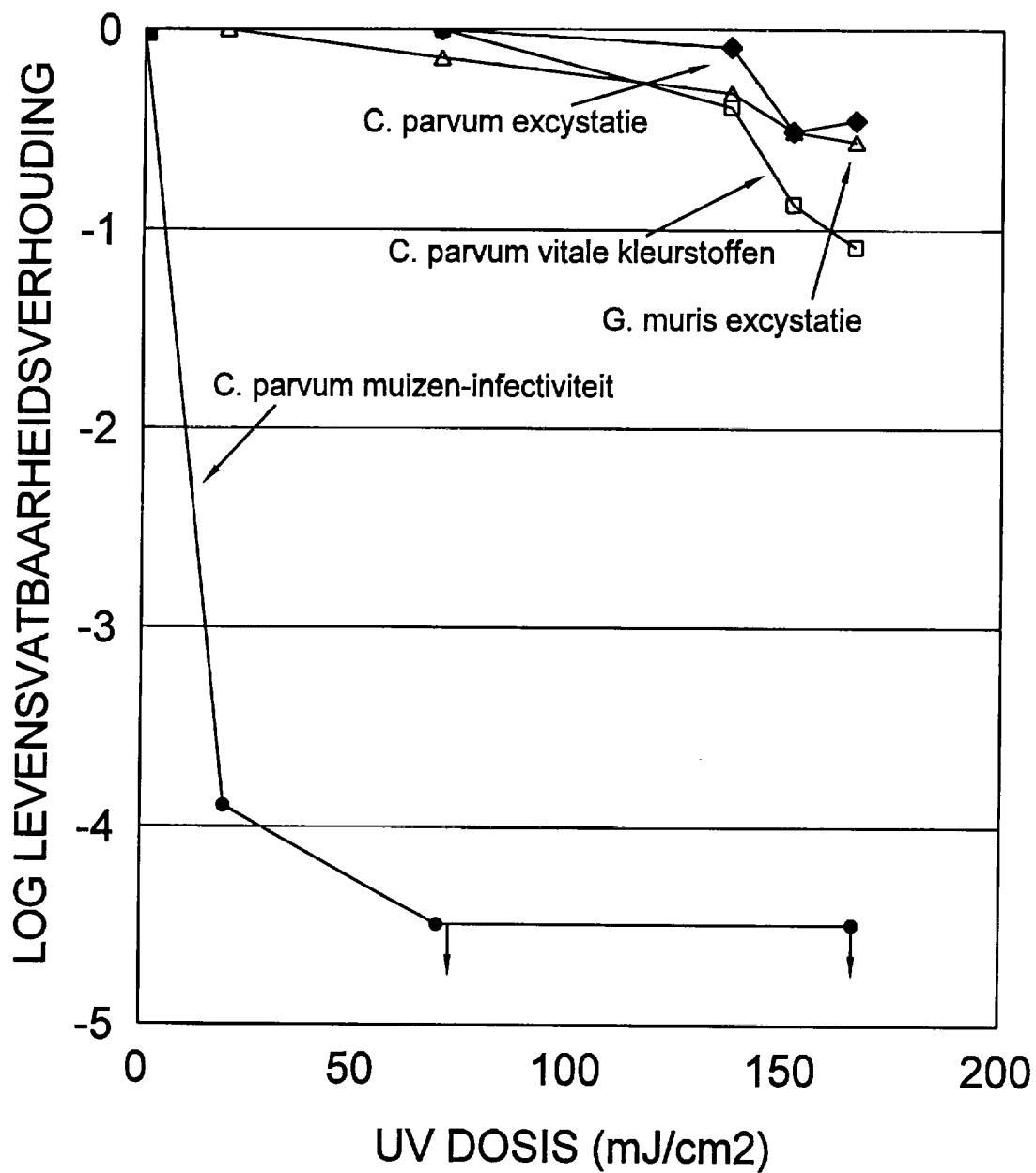


Fig. 1

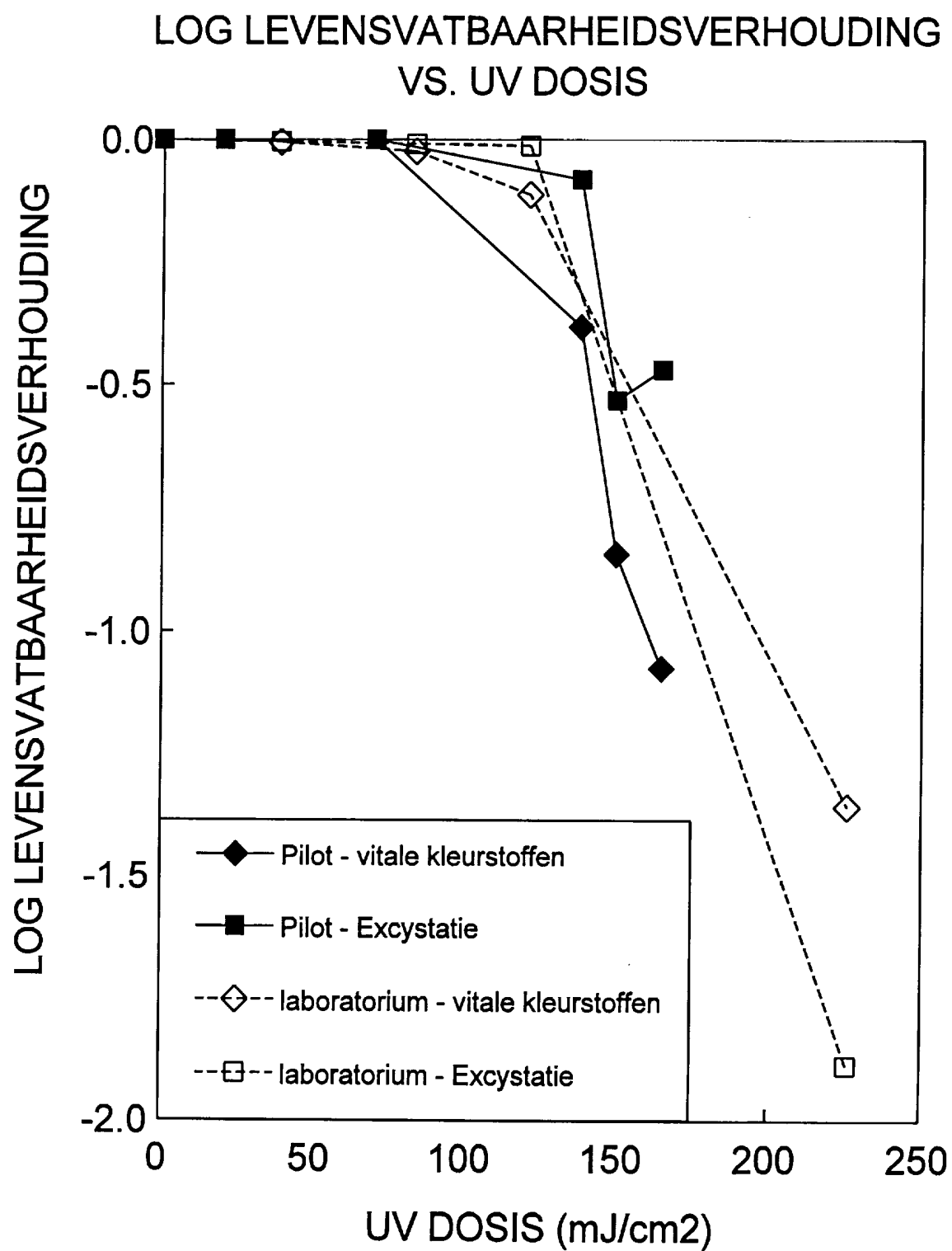


Fig. 2

RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Van belang zijnde literatuur			
Categorie *	Vermelding van literatuur met aanduiding, voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde tekstgedeelten of figuren.	Van belang voor conclusie(s) Nr.:	International Patent Classification (IPC)
X	WO-A-9.715.332 (J.E. Dunn e.a.; Purepulse Technology) 1 mei 1997 * gehele document *	1	C02F 1/32
A, D	GB-A-2.292.097 (M.R. Snowball; Water Recovery Plc) 14 februari 1996 * blz. 4, r. 22 - 34 en conclusie 5 *	1 - 3	Onderzochte gebieden van de techniek, gedefinieerd volgens IPC 7
A, D	Wat. Res. 29 (11) 1995, blz. 2583-2586 (A.T. Campbell e.a.) * blz. 2584, 1e alinea: "U.V. disinfection unit " *	1 - 3	C02F 1/32
A	Handbook of Water Purification, 2nd ed., 1987, ed. W. Lorch, Ellis Horwood; Ch.16 Ultraviolet sterilization * o.a. blz. 559, tabel 16.8 *	1 - 3	Computerbestanden Epodoc PAJ WPI
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op:			* Verklaring van de categorie-aanduiding: zie apart blad
Omvang van het onderzoek: volledig			
Onderzochte conclusies:			
Niet (volledig) onderzochte conclusies met redenen:			
Datum waarop het onderzoek werd voltooid: 22 oktober 1999		Vooronderzoeker: Mw.Dr. M.M. van Leijen	

Categorie van de vermelde literatuur:

- X: op zichzelf van bijzonder belang zijnde stand van de techniek
- Y: in samenhang met andere geciteerde literatuur van bijzonder belang zijnde stand van de techniek
- A: niet tot de categorie X of Y behorende van belang zijnde stand van de techniek
- O: verwijzend naar niet op schrift gestelde stand van de techniek
- P: literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum
- T: niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding
- E: colliderende octrooiaanvraag
- D: in de aanvraag genoemd
- L: om andere redenen vermelde literatuur
- &: lid van dezelfde octrooifamilie; corresponderende literatuur

AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE
STAND VAN DE TECHNIEK, UITGEVOERD IN OCTROOIAANVRAGE NR.1012059

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooigeschriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau 16 November 1999

De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door de Octrooiraad gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

In het rapport genoemd octrooi- geschrift	datum van publicatie	overeenkomend(e) geschrift(en)	datum van publicatie
WO9715332 A	1997-05-01		
		CA2235244 A	1997-05-01
		AU7430296 A	1997-05-15
		EP0873143 A	1998-10-28
		US5900211 A	1999-05-04
GB2292097 AB	1996-02-14		
		WO9605141 A	1996-02-22
		AU3227195 A	1996-03-07
		EP0775089 AB	1997-05-28
		AU687233 B	1998-02-19
		JP10504236T T	1998-04-28
		DE69509393D D	1999-06-02
		US5951876 A	1999-09-14